

Rec'd PCT/PTC 06 DEC 2004

PCT/EP 03 / 06 45 9

R E P U B L I Q U E F R A N C A I S E



REC'D 01 AUG 2003

WIPO

PCT

BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 23 MAI 2003

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE

SIEGE
26 bis, rue de Saint Petersburg
75800 PARIS cedex 08
Téléphone : 33 (0)1 53 04 53 04
Télécopie : 33 (0)1 53 04 45 23
www.inpi.fr

1er dépôt

BREVET D'INVENTION CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI


N° 11354*01

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

page 1/2



26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08
Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04 Télécopie : 33 (1) 42 94 86 54

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

08 540 W / 300301

REQUÊTE DES PIÈCES DATE LIEU 06 JUIN 2002 N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI 0206948 INPI DATE DE DÉPÔT ATTRIBUÉE PAR L'INPI - 6 JUIN 2002		<input checked="" type="checkbox"/> NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE CABINET BRAU DE LOMENIE 158, rue de l'Université 75340 PARIS CEDEX 07	
Vos références pour ce dossier H189130/19/CBU <i>(facultatif)</i>			
Confirmation d'un dépôt par télécopie		<input type="checkbox"/> N° attribué par l'INPI à la télécopie	
<input checked="" type="checkbox"/> NATURE DE LA DEMANDE		Cochez l'une des 4 cases suivantes	
Demande de brevet		<input checked="" type="checkbox"/>	
Demande de certificat d'utilité		<input type="checkbox"/>	
Demande divisionnaire		<input type="checkbox"/>	
Demande de brevet initiale N° _____ Date _____ ou demande de certificat d'utilité initiale N° _____ Date _____			
Transformation d'une demande de brevet européen Demande de brevet initiale N° _____ Date _____			
<input checked="" type="checkbox"/> TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum) Entité fluorescente comportant un fluorophore lié de manière covalente à au moins un oligonucléotide et comportant au moins un groupe fonctionnel et ses utilisations			
<input checked="" type="checkbox"/> DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE		Pays ou organisation _____ N° _____ Date _____ Pays ou organisation _____ N° _____ Date _____ Pays ou organisation _____ N° _____ Date _____ <input type="checkbox"/> S'il y a d'autres priorités, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»	
<input checked="" type="checkbox"/> DEMANDEUR		<input type="checkbox"/> S'il y a d'autres demandeurs, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»	
Nom ou dénomination sociale		CIS bio international	
Prénoms			
Forme juridique		Société Anonyme	
N° SIREN		_____	
Code APE-NAF		_____	
Adresse	Rue	RM 306	
	Code postal et ville	91400 SACLAY	
	Pays	FRANCE	
Nationalité		FRANCAISE	
N° de téléphone <i>(facultatif)</i>			
N° de télécopie <i>(facultatif)</i>			
Adresse électronique <i>(facultatif)</i>			

Remplir impérativement la 2^{ème} page



1er dépôt

BREVET D'INVENTION
CERTIFICAT D'UTILITÉREQUÊTE EN DÉLIVRANCE
page 2/2

REMISE DES PIÈCES		Réservé à l'INPI	
DATE			
LIEU		INPI	
N° D'ENREGISTREMENT		0206948-6	
NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI		6 JUIN 2002	
DS 540 VI / 300301			
Vos références pour ce dossier : (facultatif)		B189130/19/CBU	
<input checked="" type="checkbox"/> MANDATAIRE			
Nom			
Prénom			
Cabinet ou Société		CABINET BEAU DE LOMENIE	
N° de pouvoir permanent et/ou de lien contractuel			
Adresse	Rue	158, rue de l'Université	
	Code postal et ville	75 340 PARIS CEDEX 07	
N° de téléphone (facultatif)		01.44.18.89.00	
N° de télécopie (facultatif)		01.44.18.04.23	
Adresse électronique (facultatif)			
<input checked="" type="checkbox"/> INVENTEUR (S)			
Les inventeurs sont les demandeurs		<input type="checkbox"/> Oui <input checked="" type="checkbox"/> Non Dans ce cas fournir une désignation d'inventeur(s) séparée	
<input checked="" type="checkbox"/> RAPPORT DE RECHERCHE		Uniquement pour une demande de brevet (y compris division ou transformation)	
Établissement immédiat ou établissement différé		<input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	
Paiement échelonné de la redevance		Paiement en deux versements, uniquement pour les personnes physiques <input type="checkbox"/> Oui <input checked="" type="checkbox"/> Non	
<input checked="" type="checkbox"/> RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES		Uniquement pour les personnes physiques <input type="checkbox"/> Requête pour la première fois pour cette invention (joindre un avis de non-imposition) <input type="checkbox"/> Requête antérieurement à ce dépôt (joindre une copie de la décision d'admission pour cette invention ou indiquer sa référence):	
Si vous avez utilisé l'imprimé «Suite», indiquez le nombre de pages jointes			
<input checked="" type="checkbox"/> SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire) Philippe HUBERT CPI N° 94-0308		VISA DE LA PRÉFECTURE OU DE L'INPI C. MARTIN	

La loi n°78-17 du 6 janvier 1978 relative à l'informatique, aux fichiers et aux libertés s'applique aux réponses faites à ce formulaire.
Elle garantit un droit d'accès et de rectification pour les données vous concernant auprès de l'INPI.

L'invention concerne une entité fluorescente comportant un fluorophore, lié de manière covalente à un ou plusieurs oligonucléotides ou analogues d'oligonucléotide et comportant au moins un groupe fonctionnel, introduit ou généré sur le fluorophore ou l'un des oligonucléotides ou analogues d'oligonucléotides.

5 De nombreuses familles de molécules organiques sont utilisées comme marqueurs fluorescents de biomolécules dans nombre d'applications, notamment pour des méthodes de diagnostic permettant de suivre ou de quantifier ces biomolécules.

On peut notamment citer les rhodamines, les cyanines, les squaraines ou
10 les bodipy dyes. la plupart de ces molécules possèdent un coefficient d'extinction molaire élevé (souvent supérieur à $100\,000\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$) et un rendement quantique de fluorescence généralement supérieur à 20%.

Toutefois, du fait de leur nature souvent très hydrophobe, ces molécules organiques ont tendance à former des agrégats à la surface des biomolécules,
15 notamment les protéines, lorsque l'on veut disposer de plusieurs marqueurs fluorescents par protéine (U. Schobel et al., Bioconjugate chem., 1999, 10, 1107-1114). Ces agrégats étant quasiment non fluorescents, le rendement quantique moyen des molécules fluorescentes présentes à la surface des protéines est alors significativement plus bas que celui des molécules natives.

20 Pour pallier ce problème, il a été tenté dans la littérature d'augmenter la nature hydrophile des molécules fluorescentes, notamment par l'ajout de groupes sulfonates (US 5,268, 486). On peut aussi citer l'ajout de sucres ou de résidus carbohydrates à la structure des molécules fluorescentes (WO 98/49176). Cependant, l'ajout de ces motifs limite le phénomène d'agrégation sans le
25 supprimer.

D'autres voies ont été aussi utilisées pour éviter la baisse de rendement quantique de fluorescence après marquage à des protéines. La demande WO 98/26287 décrit un procédé utilisant des cyclodextrines pour encapsuler des molécules fluorescentes à la surface des protéines et limiter leur agrégation.
30 Cependant, cette technique ne fonctionne pas de manière satisfaisante avec tous les types de molécules.

Il a été récemment décrit une technique permettant d'obtenir des protéines ne possédant à leur surface qu'une seule molécule fluorescente et de pouvoir ainsi maintenir un rendement quantique élevé en évitant le phénomène d'agrégation

(Winckler et al., Specific labeling of proteins using reactive affinity tag-dye systems, SBS Conference, Vancouver, 2000). Ce système est limitant puisqu'il ne permet pas de disposer de plusieurs molécules fluorescentes par protéine.

5 Le problème à résoudre consiste donc à fournir un marqueur pouvant être lié à une biomolécule, dont les propriétés photophysiques ne soient pas altérées, notamment par des phénomènes d'agrégation, lorsque plusieurs de ces marqueurs sont liés simultanément à une biomolécule, en particulier une protéine.

Selon l'invention, ce problème peut être résolu par la liaison du fluorophore à un ou plusieurs oligonucléotide(s) ou analogue(s) d'oligonucléotide(s), le composé
10 ainsi formé comportant de plus un ou plusieurs groupe(s) réactionnel(s) permettant sa liaison à une molécule porteuse.

L'invention concerne donc, selon un premier aspect, une entité fluorescente comportant un fluorophore à l'exception d'un cryptate de terre rare, lié de manière covalente à un ou plusieurs oligonucléotide(s) ou analogue(s) d'oligonucléotide(s),
15 caractérisée en ce qu'elle comporte au moins un groupe fonctionnel, introduit ou généré sur le fluorophore ou sur l'un des oligonucléotides ou analogues d'oligonucléotide.

Le fluorophore de l'entité selon l'invention comprend de préférence un ou plusieurs noyaux aromatiques et a un coefficient d'extinction moléculaire élevé,
20 supérieur à 20000, de préférence supérieur à 50000.

Ledit fluorophore est de préférence choisi parmi les rhodamines, les cyanines, les squaraines, les bodipys, les fluoescéines et leurs dérivés.

Le terme « oligonucléotide » désigne indifféremment les oligodésoxyribonucléotides (fragment d'ADN) ou les oligoribonucléotides (fragment
25 d'ARN).

Par « oligonucléotide ou analogue d'oligonucléotide » on entend dans la présente description :

- soit un enchaînement d'unités ribonucléotides ou désoxyribonucléotides liées entre elles par des liaisons de type phosphodiester ;
- 30 - soit un enchaînement d'unités ribonucléotides ou désoxyribonucléotides ou d'unités analogues de nucléotides modifiées sur le sucre ou sur la base et liées entre elles par des liaisons internucléotidiques naturelles de type phosphodiester, une partie des liaisons internucléotidiques étant éventuellement remplacée par des liaisons phosphonate, phosphoramidate ou phosphorothioate. Ces différentes familles

d'oligonucléotides sont décrites dans Goodchild, *Bioconjugate Chemistry*, 1(3), May/June 1990, 77-99 ;

5 - soit un enchaînement comprenant à la fois des unités ribonucléotides ou désoxyribonucléotides liées entre elles par des liaisons de type phosphodiester et des unités analogues de nucléosides liées entre elles par des liaisons amides, communément dénommés « PNA » (en anglais « peptide nucleic acid »), tel que décrit dans M. Egholm et al., J. Am. Chem. Soc., 1992, 114, 1895-1897 ; de tels composés sont par exemple décrits dans R. Vinayak et al., *Nucleoside & Nucleotide*, 1997, 16 (7-9), 1653-1656.

10 - soit un enchaînement d'unités ribonucléotides ou désoxyribonucléotides dans lequel une partie des nucléosides ou des liaisons internucléotidiques ont été modifiées par rapport à un oligoribonucléotide ou un oligodésoxyribonucléotide naturel formé des nucléosides communs (adénosine, désoxyadénosine, cytidine, désoxycytidine, guanosine, désoxyguanosine, uridine ou thymidine) liés par des
15 ponts phosphates, par exemple un oligonucléotide phosphorothioate (OPT) dans lequel tout ou une partie des ponts phosphates ont été remplacés par des ponts thiophosphates (P.J. Romaniuk, F. Eckstein (1982) J. Biol. Chem. 257, 7684).

L'utilisation de chacun de ces types d'oligonucléotides constitue un aspect avantageux de l'invention.

20 On entend par « analogue » de nucléotide ou de nucléoside un nucléotide/nucléoside comportant au moins une modification portant sur le sucre ou la nucléobase ou une combinaison de ces modifications. A titre d'exemple, on peut citer les modifications suivantes :

25 I. Modifications concernant le sucre (analogues de nucléotides ou de nucléosides) :

1°) La partie sucre peut être modifiée en ce que la configuration des hydroxyles (libres ou engagés dans un pont phosphate) est différente de la configuration naturelle (qui est respectivement β -D-érythro en série ADN et β -D-ribo en série ARN) comme dans les analogues ayant le squelette β -D-arabino-
30 pentofuranoside ou β -D-xylo-pentofuranoside, par exemple.

2°) La structure peut être modifiée en ce que les liaisons internucléotidiques sont de type 2' → 5', tel que dans le cas des dérivés β -D-ribo-pentofuranoside-2'-phosphate ou 3'-désoxy- β -D-érythro-pentofuranoside-2'-phosphate.

Il existe des nucléotides dont la structure regroupe les deux modifications
5 précédentes, tel que le β -D-xylo-pentofuranoside-2'-phosphate.

3°) La structure peut différer du modèle naturel en ce que la configuration du carbone 4' est opposée, c'est le cas α -L-thréo-pentofuranoside-3'-phosphate. La différence peut porter sur la configuration du carbone en 1' (position anomérique) c'est le cas du α -D-érythro-pentofuranoside-3'-phosphate. Il existe des nucléotides/
10 nucléosides dont la structure regroupe les deux modifications précédentes, tel que le β -L-thréo-pentofuranoside-3'-phosphate.

4°) La structure peut différer du modèle naturel en ce que l'oxygène en 4' est remplacé par un carbone (analogue carbocyclique) ou par un soufre tel que le 4'-Thio- β -D-érythro-pentofuranoside-3'-phosphate.

15 5°) La structure peut différer du modèle naturel en ce que l'un des hydroxyle du sucre est alkylé, par exemple dans le squelette 2'-O-Alkyl- β -D-ribo-pentofuranoside-3'-phosphate, le groupe alkyle pouvant être par exemple le groupe méthyle ou allyle.

6°) La structure peut différer du modèle naturel en ce que seule la partie
20 sucre est conservée comme dans le 1,2-didésoxy-D-érythro-pentofuranose-3-phosphate, ou en ce que le sucre est remplacé par un polyol comme le propanediol.

II. Modifications concernant la nucléobase (analogues de nucléotide) :

1°) La nucléobase peut être modifiée en ce que les substituants des bases
25 naturelles sont modifiés comme dans la 2,6-diaminopurine, l'hypoxanthine, la 4-Thio-thymine, le 4-Thio-uracil, ou le 5-Ethynyl-uracil.

2°) Les positions des substituants peuvent être permutées par rapport aux bases naturelles tel que dans l'Isoguanosine ou l'Isocytosine.

3°) Un atome d'azote de la nucléobase peut être remplacé par un carbone
30 comme dans la 7-Déaza-guanosine, la 7-Déaza-adénine.

III. Modifications concernant la liaison internucléotidique :

Par ailleurs, comme mentionné ci-dessus, les liaisons entre les unités sucres ou leurs analogues peuvent également être modifiées, par exemple en remplaçant

un ou plusieurs des atomes d'oxygène de la liaison phosphodiester naturelle par un carbone (série phosphonates), un azote (série phosphoramides), ou un soufre (phosphorothioates).

5 Les liaisons internucléotidiques peuvent être également remplacées par des liaisons amides comme dans les analogues d'oligonucléotides de type « PNA ».

Selon un aspect préféré, l'oligonucléotide est constitué d'un enchaînement comprenant à la fois des unités ribonucléotides ou désoxyribonucléotides liées entre elles par des liaisons de type phosphodiester et des unités analogues de
10 nucléosides liées entre elles par des liaisons amide.

En particulier, dans ce cas, ledit oligonucléotide peut comprendre au moins 5 liaisons internucléotidiques de type phosphodiester à l'extrémité destinée à être liée au fluorophore.

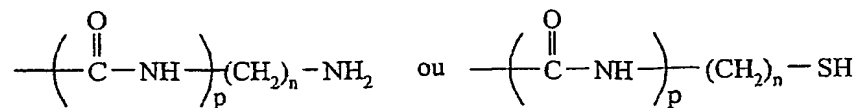
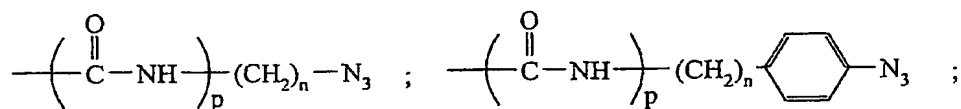
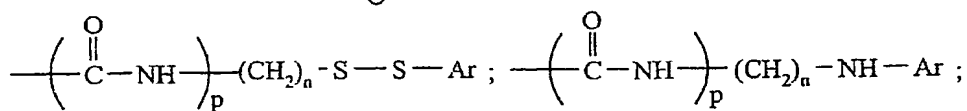
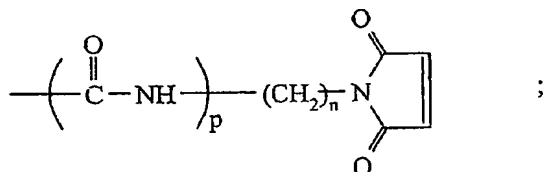
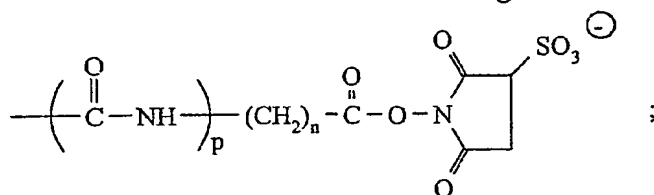
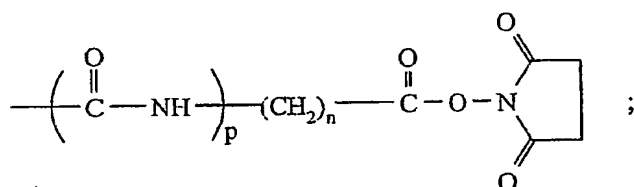
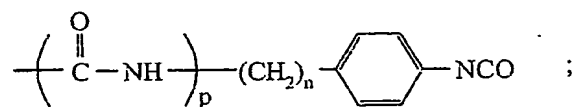
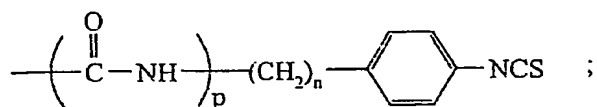
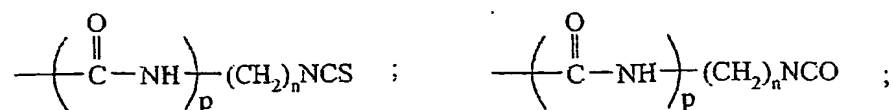
De préférence, ledit oligonucléotide ou analogue d'oligonucléotide comprend
15 de 5 à 60 unités nucléotidiques, en particulier de 5 à 20, de préférence 5 à 15 unités nucléotidiques.

L'entité fluorescente selon l'invention doit comporter au moins un groupe fonctionnel permettant son couplage avec une molécule porteuse.

Avantageusement, le groupe fonctionnel est une fonction amine d'une unité
20 nucléotidique de l'oligonucléotide ou de l'analogue d'oligonucléotide, ou résulte de la réaction d'une fonction amine libre d'une unité nucléotidique de l'oligonucléotide ou de l'analogue d'oligonucléotide à l'aide d'un réactif homo-bifonctionnel ou hétéro-bifonctionnel permettant d'introduire un groupe fonctionnel choisi parmi les groupes ester activé d'un acide carboxylique, acide carboxylique, isothiocyanate, aldéhyde,
25 carbonyle, halogénure de sulfonyle, halogénure d'alkyle, azide, hydrazide, dichlorotriazine, anhydride, halogénoacétamide, maléimide et sulfhydryle. Les réactifs homo-bifonctionnels et hétéro-bifonctionnels ainsi que leur utilisation sont décrits dans « Bioconjugation » (chapitres 5.3 à 5.6, M. Aslam & A. Dent, Macmillan, London, 1998).

30 Ledit groupe fonctionnel peut, par exemple, résulter de la réaction d'une fonction amine libre d'une unité nucléotidique de l'oligonucléotide ou de l'analogue d'oligonucléotide avec un ester de N-hydroxysuccinimidyle.

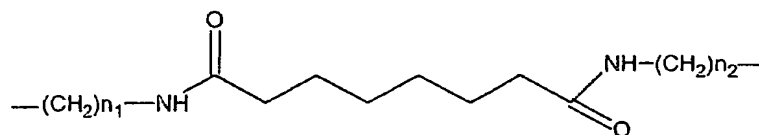
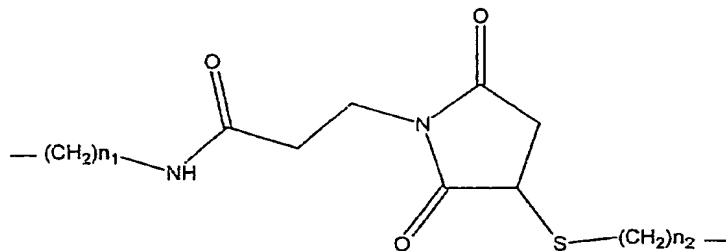
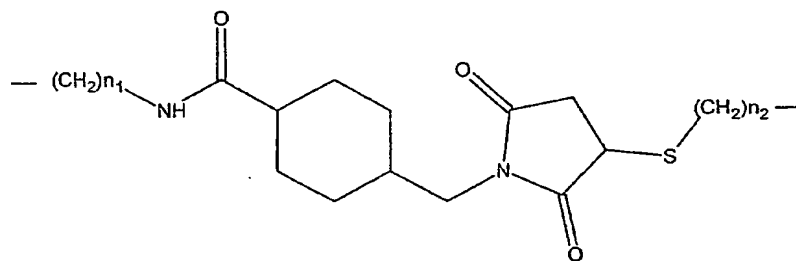
Selon un aspect préféré, le groupe fonctionnel est choisi parmi les groupes :
maléimide, acide carboxylique, haloacétamide, halogénure d'alkyle, azido,
hydrazido, aldéhyde, cétone, amino, sulfhydryl, isothiocyanate, isocyanate,
5 d'acide, hydroxysuccinimide ester, hydroxysulfosuccinimide ester, imido ester,
hydrazide, azidonitrophényl, azidophényl, azide, 3-(2-pyridyl dithio)-propionamide,
glyoxal et plus particulièrement les groupements de formule :



où n varie de 0 à 8 et p est égal à 0 ou 1, et Ar est un hétérocycle à 5 ou 6 chaînons comprenant 1 à 3 hétéroatomes, éventuellement substitué par un atome d'halogène.

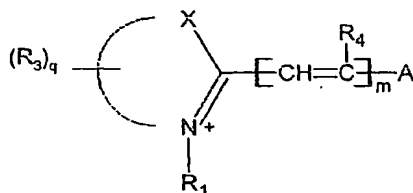
Selon un aspect avantageux, le ou les groupes fonctionnels sont liés au fluorophore et/ou à l'oligonucléotide par l'intermédiaire d'un bras d'espacement constitué par un radical organique bivalent, choisi parmi les groupes alkylène linéaires ou ramifiés en C_1 - C_{20} , contenant éventuellement une ou plusieurs doubles liaisons ou triples liaisons et/ou contenant éventuellement un ou plusieurs hétéroatomes, tels que l'oxygène, l'azote, le soufre, le phosphore ou un ou plusieurs groupe(s) carbamoyle ou carboxamido ; les groupes cycloalkylène en C_5 - C_8 et les groupes arylène en C_6 - C_{14} , lesdits groupes alkylène, cycloalkylène ou arylène étant éventuellement substitués par des groupes alkyle, aryle ou sulfonate.

En particulier, le bras d'espacement est choisi parmi les groupes :



dans lesquels n_1 et n_2 sont compris entre 2 et 6.

Selon un aspect préféré, l'invention concerne une entité fluorescente de formule (I)

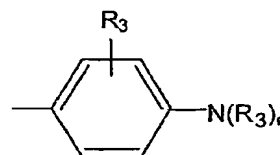
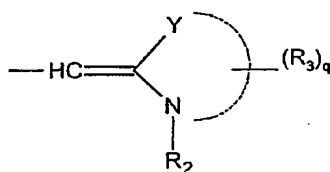


5

(I)

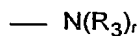
dans laquelle :

- A représente un groupe choisi parmi :



$r = 2$ ou 3

10



$r = 2$ ou 3

15

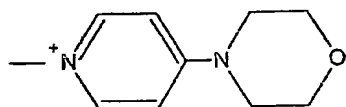
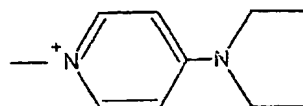
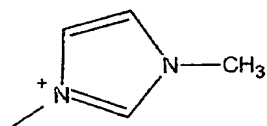
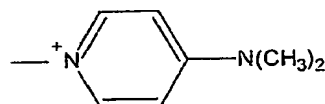
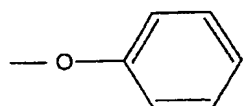
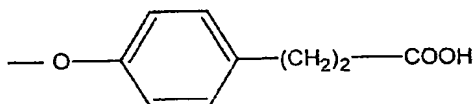
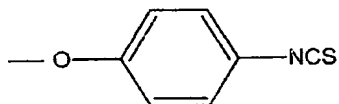
- les lignes en pointillé représentent chacune les atomes de carbone nécessaires pour former 1 à 3 cycles fusionnés, les groupes R_3 étant attachés à ces cycles ;
- X et Y représentent chacun N, C=O, O, S ou $C(CH_3)_2$
- m vaut 1, 2, 3 ou 4 ;
- q vaut 1, 2 ou 3 ;
- $(R_3)_q$ représente q groupes R_3 , identiques ou différents ;
- les groupes R_1 , R_2 , R_3 sont identiques ou différents sont choisis parmi l'hydrogène; un groupe $-(CH_2)_s-Z$ dans lequel s varie de 0 à 4 et Z représente un groupe CH_3 , SO_3H , OH ou $N^+R_1R_2R_3$ dans lequel R_1 , R_2 et R_3 sont tels

20

que définis ci-dessus ; un groupe fonctionnel tel que défini plus haut ; et un oligonucléotide ou analogue d'oligonucléotide comportant éventuellement un groupe fonctionnel tel que défini plus haut ;

- R_4 est choisi parmi : H ; OH ; CH_3 ; Cl et les groupes de formule :

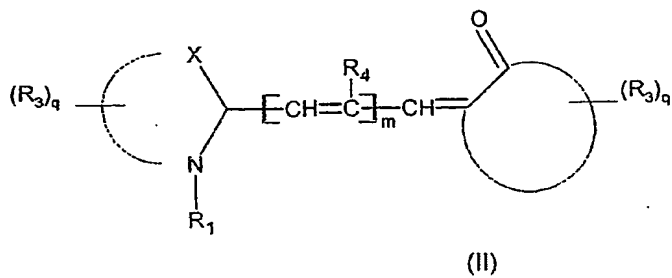
5



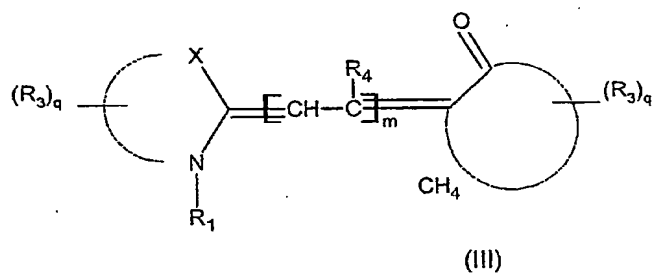
les substituants R_4 en position allylique pouvant former avec la chaîne polyéthylénique 1 à 3 cycles fusionnés contenant de 4 à 14 atomes, saturés ou non, lesdits cycles pouvant contenir un ou plusieurs atomes de O, N, S et éventuellement être substitués par un groupe oxo.

10

Des entités fluorescentes préférées selon l'invention répondent aux formules (II) et (III)

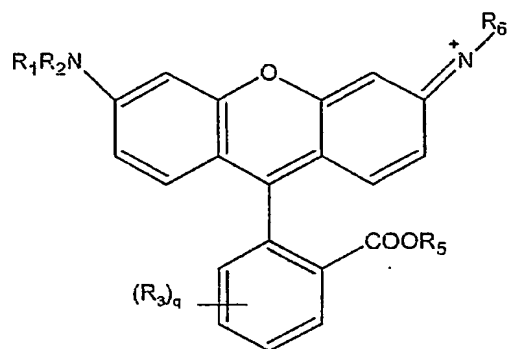


ou

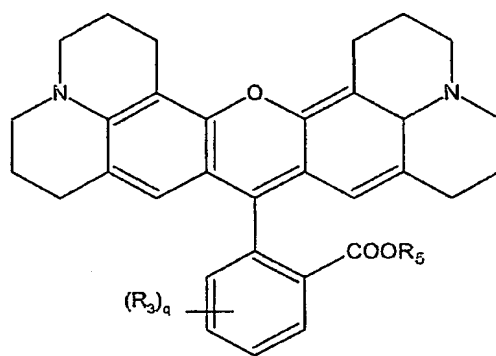


- 5 dans lesquelles les lignes en pointillé, R_1, R_2, R_3, R_4, X, m et q sont tels que définis ci-dessus pour la formule (I).

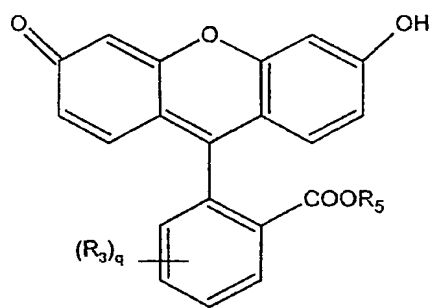
Avantageusement, l'invention concerne des entités fluorescentes de formule (IV), (V), (VI) ou (VII)



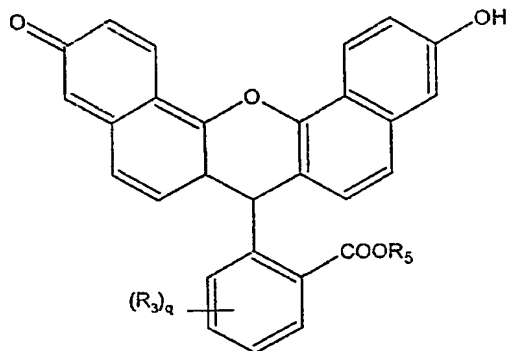
(IV)



(V)



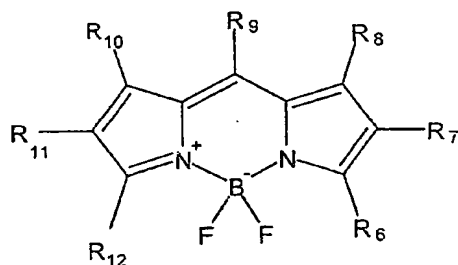
(VI)



(VII)

dans lesquelles R_1 , R_2 , R_3 et R_5 sont identiques ou différents et sont choisis parmi
 5 l'hydrogène; un groupe $-(CH_2)_s-Z$ dans lequel s varie de 0 à 4 et Z représente un
 groupe CH_3 , SO_3H , OH ou $N^+R_1R_2R_3$ dans lequel R_1 , R_2 et R_3 sont tels que
 définis ci-dessus; un groupe fonctionnel ou un oligonucléotide ou analogue
 d'oligonucléotide tel que défini plus haut.

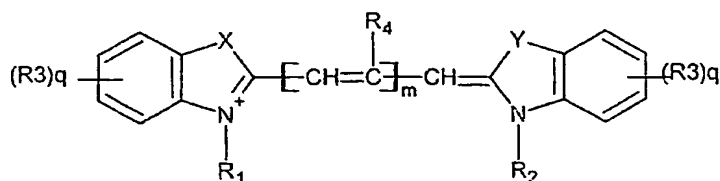
Selon un autre aspect préféré, l'invention concerne une entité fluorescente de
 10 formule (VIII)



(VIII)

dans laquelle les substituants R_6 à R_{12} sont choisis parmi: l'hydrogène; un
 halogène; un alkyle; un cycloalkyle; aryl; arylalkyl; acyl; sulfo; un groupe
 fonctionnel ou un oligonucléotide ou analogue d'oligonucléotide tel que défini plus
 haut.

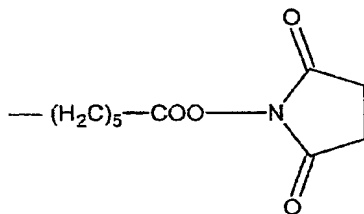
25 Une autre entité fluorescente selon l'invention répond à la formule (IX)



(IX)

dans laquelle R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , X , Y , m et q sont tels que définis plus haut.

- 5 Des entités de formule (IX), particulièrement préférées sont celles dans lesquelles X et Y représentent un groupe $C(CH_3)_2$, ainsi que celles dans lesquelles
- R_1 et R_2 représentent un alkyle comportant de 1 à 4 atomes de carbone ou un groupe de formule ci-dessous, l'un au moins des groupes R_1 et R_2 représentant un groupe de formule ci-dessous :



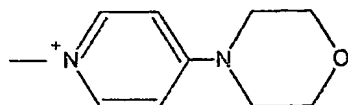
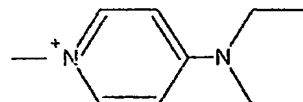
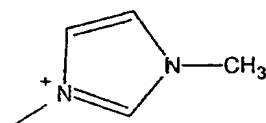
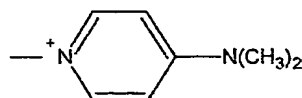
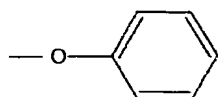
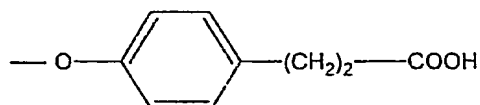
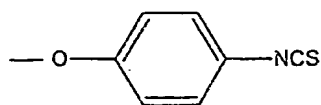
10

- R_4 représente l'hydrogène
- $q = 1$, $m = 2$

R_3 représente l'hydrogène; un groupe $-(CH_2)_s-Z$ dans lequel s varie de 0 à 4 et Z représente un groupe CH_3 , SO_3H , OH ou $N^+R_1R_2R_3$ dans lequel R_1 , R_2 et R_3 sont tels que définis ci-dessus ; un groupe fonctionnel ou un oligonucléotide ou analogue d'oligonucléotide tel que défini plus haut ;

15

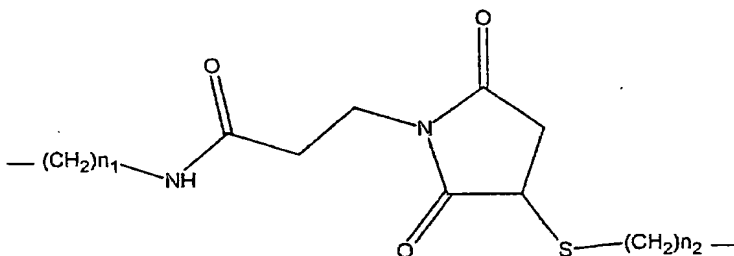
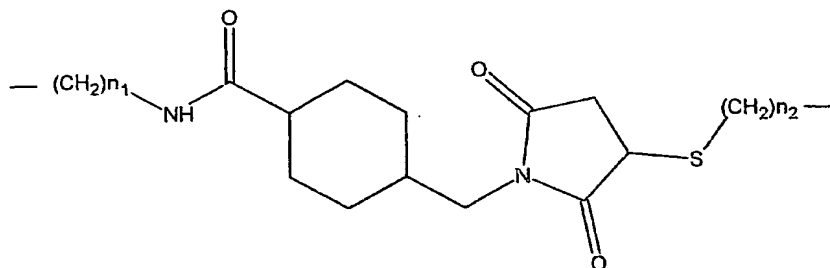
- R_4 est choisi parmi : H ; OH ; CH_3 ; Cl et les groupes de formule :



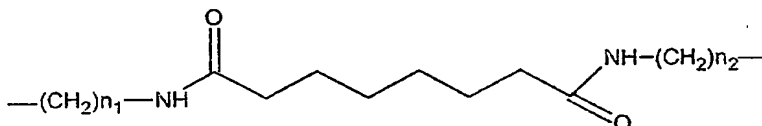
les substituents R_4 en position allylique pouvant former avec la chaîne polyéthylénique 1 à 3 cycles fusionnés contenant de 4 à 14 atomes, saturés ou non, lesdits cycles pouvant contenir un ou plusieurs atomes de O, N, S et éventuellement être substitués par un groupe oxo.

Avantageusement, l'entité fluorescente selon l'invention comporte un fluorophore qui est lié de manière covalente à l'oligonucléotide, soit directement, soit par l'intermédiaire d'un bras d'espacement.

- 10 Ce bras d'espacement peut être par exemple constitué par un radical organique bivalent, choisi parmi les groupes alkylène linéaires ou ramifiés en C_1 - C_{20} , contenant éventuellement une ou plusieurs doubles liaisons ou triples liaisons et/ou contenant éventuellement un ou plusieurs hétéroatomes, tels que l'oxygène, l'azote, le soufre, le phosphore ou un ou plusieurs groupe(s) carbamoyle ou
- 15 carboxamido ; les groupes cycloalkylène en C_5 - C_8 et les groupes arylène en C_6 - C_{14} , lesdits groupes alkylène, cycloalkylène ou arylène étant éventuellement substitués par des groupes alkyle, aryle ou sulfonate ou choisi parmi les groupes :



5



dans lesquels n_1 et n_2 sont compris entre 2 et 6.

10 L'invention concerne également, selon un aspect ultérieur, les conjugués fluorescents constitués d'une entité telle que définie ci-dessus liée de manière covalente à une molécule porteuse.

Des conjugués avantageux sont ceux dans lesquels le rapport molaire final, défini comme le nombre de moles d'entités fluorescentes par molécule porteuse, est supérieur à 0 et inférieur à 100, de préférence inférieur à 20.

15 La molécule porteuse est par exemple un anticorps, un antigène, un messenger intracellulaire, un messenger intercellulaire, une protéine, un peptide, un haptène, une lectine, la biotine, l'avidine, la streptavidine, une toxine, un glucide, un

oligosaccharide, un polysaccharide, un acide nucléique, une hormone, une vitamine, un médicament, un polymère, une particule polymérique, du verre, une particule de verre ou une surface en verre ou en polymère.

5 L'utilisation des entités fluorescentes selon l'invention permet de réaliser des conjugués présentant une agrégation du fluorophore quasiment nulle. Dès lors, le rendement quantique du fluorophore peut être presque totalement conservé après liaison à des molécules porteuses, même lorsque le rendement molaire final (nombre de moles d'entités fluorescentes par molécule porteuse) augmente.

10 Ceci rend ces conjugués très intéressants pour une utilisation dans un système fluorescent utilisant le transfert d'énergie non radiatif (type HTRF). Ils présentent aussi un grand intérêt dans des techniques de détection par fluorescence plus classiques où le nombre de fluorophores par molécule porteuse, le rendement quantique et le coefficient d'extinction molaire du fluorophore sont des critères prépondérants pour la sensibilité de ces systèmes.

15 L'invention concerne donc également l'utilisation d'une entité fluorescente ou d'un conjugué fluorescent tels que définis ci-dessus comme traceur(s) fluorescent(s), par exemple pour la détection et/ou la détermination par fluorescence d'un analyte dans un milieu susceptible de le contenir ou pour la détermination d'une interaction entre biomolécules ; pour la détermination d'une
20 activité biologique telle que : une activité enzymatique, l'activation d'un récepteur membranaire, la transcription d'un gène, un transport membranaire, une variation de la polarisation membranaire, en particulier dans un procédé de criblage de médicaments.

25 Les conjugués fluorescents selon l'invention peuvent être utilisés en tant que composés fluorescents accepteurs en présence de composés fluorescents donneurs ou en tant que composés fluorescents donneurs en présence de composés fluorescents accepteurs, en particulier en microscopie de fluorescence, en cytométrie de flux, en polarisation de fluorescence ou en corrélation de fluorescence.

30 Ils peuvent également être avantageusement utilisés en tant qu'agent de contraste pour l'imagerie optique *in vivo*.

L'invention a encore pour objet un procédé de diminution du phénomène d'agrégation à la surface d'une molécule porteuse liée à un fluorophore, caractérisé

en ce qu'on utilise à la place dudit fluorophore une entité fluorescente telle que définie ci-dessus.

Enfin, l'invention a pour objet un procédé d'augmentation de rendement quantique d'un fluorophore lié à une molécule porteuse, caractérisé en ce qu'on
5 utilise comme fluorophore une entité fluorescente telle que définie ci-dessus.

Les entités fluorescentes selon l'invention peuvent être préparées comme décrit ci-dessous en couplant des oligonucléotides « fonctionnalisés » avec un fluorophore.

Par « oligonucléotide fonctionnalisé », on entend dans la présente
10 description un oligonucléotide comportant au moins une fonction chimiquement réactive ou un groupe chimique (tel qu'un groupe fluorescent) qui n'est pas présent dans un oligonucléotide naturel et résultant de l'incorporation d'un nucléotide modifié ou d'une unité non-nucléotidique portant cette fonction chimiquement
15 réactive ou ce groupe chimique. Cette fonction chimiquement réactive permet entre autre de réaliser la synthèse de conjugués d'oligonucléotides ou d'oligonucléotides modifiés. Les termes « fonction chimiquement réactive », « nucléotide modifié », « unité non-nucléotidique » et « conjugués d'oligonucléotides » s'entendent dans le sens décrit par exemple dans la revue de J. Goodchild [Conjugates of
oligonucleotides and modified oligonucleotides: A review of their synthesis and
20 properties. *Bioconjugate chemistry*, (1990) 1(3), 77-99]. Le terme « oligonucléotide naturel » désigne un polynucléotide formé par l'enchaînement d'unités nucléotidiques existantes dans les acides nucléiques [Abbreviations and symbols for the description of conformations of polynucleotide chains. *Eur. J. Biochem.* (1983) 131, 9-15].

25 Les exemples suivants illustrent non limitativement l'invention.

Les abréviations suivantes sont utilisées :

DTT :	dithiothréitol
DSS :	subérate de N-(disuccinimidyle)
GST :	glutathione S-transférase
30 MOPS :	acide 3-[N-morpholino]propanesulfonique
SPDP :	N-succinimidyl-3-(2-pyridyldithio)propionate
SSMCC:	ester 3-sulfo-N-hydroxysuccinimide de l'acide 4-(N-maléimidométhyl)-cyclohexane-1-carboxylique
TEAB :	hydrogénocarbonate de triéthylammonium

TEA Ac : acétate de triéthylammonium contenant 10 % d'acétonitrile.

II SYNTHÈSE DES CONJUGUES

5 Exemple 1 : Synthèse des composés CY5-T15-hexylamine, CY5-T10-hexylamine, CY5-T5-hexylamine

Cet exemple décrit la synthèse d'un oligonucléotide de séquence T₅, T₁₀ ou T₁₅ fonctionnalisé en son extrémité 5' par une molécule de cyanine tel que la CY5 non sulfonée et en son extrémité 3' par un bras portant un groupe amine susceptible d'être utilisé pour le marquage d'une molécule biologique d'intérêt. La structure générale peut être symbolisée par ^{5'}(CY5-TTT TTT TTT T-hexylamine)₃.

Le terme hexylamine désigne un bras composé de 6 atomes de carbone, substitué ou non et portant une fonction amine.

15 Dans le présent exemple un bras 2-hydroxyméthyl-6-aminohexanol est relié par un pont phosphate formé entre l'hydroxyle en 3' du nucléotide situé à l'extrémité 3' et le 2-hydroxyméthyl du bras.

On utilise un support solide du type CPG (pour « Controlled Pore Glass ») classiquement utilisé pour la synthèse des oligonucléotides. Un tel support est dit
20 « fonctionnalisé » car sur le CPG est greffée une structure chimique portant une fonction amine protégée, capable après déprotection finale de l'oligonucléotide, de libérer une fonction amine primaire aliphatique.

On utilise un dérivé phosphoramidite de la thymidine, disponible dans le commerce, pour la synthèse de la séquence T₁₅.

25 On utilise un dérivé phosphoramidite d'une cyanine non-sulfonée, disponible dans le commerce permettant l'introduction directe du marqueur fluorescent tel que la cyanine (CY5) en position 5' de l'oligonucléotide.

La synthèse est réalisée à l'aide d'un synthétiseur automatique d'ADN (Applied Biosystems type 392) selon le protocole du fabricant. La colonne contenant
30 le support solide (CPG) greffé (1 μmole) avec un dérivé 2-O-Diméthoxytrityl-6-fluorenylméthoxycarbonylamino-hexane-1-succinoyl-long chain alkylamino-CPG est placée sur le synthétiseur, on effectue la synthèse de la séquence T₁₅ en effectuant quinze cycles de synthèse à l'aide du dérivé phosphoramidite de la thymidine, puis

on effectue un cycle de couplage en utilisant le dérivé phosphoramidite de la cyanine non-sulfonée (CY5).

- 5 A l'issue de cette synthèse, la colonne est soumise à un traitement ammoniacal (environ 2 ml d'ammoniaque aqueuse 28%), permettant de couper la liaison entre l'oligonucléotide et le support CPG, selon le protocole du fabricant. Le flacon permettant de collecter l'oligonucléotide libéré est scellé, maintenu à 50-55°C pendant 2 h, puis ramené à température ambiante. Le contenu du flacon (2 ml) est ensuite transféré dans un tube en polypropylène de 5ml puis évaporé à sec sous vide à l'aide d'un speed-vac. Le résidu est ensuite repris par 500 µl de TEAB 10mM.
- 10 La solution obtenue contient l'oligonucléotide « brut » contenant de façon prépondérante la séquence voulue $5'(\text{CY5}-(\text{T})_{15}\text{-2-oxyméthyl-6-aminohexanol})_3$.

- L'oligonucléotide pur $5'(\text{CY5}-(\text{T})_{15}\text{-2-oxyméthyl-6-aminohexanol})_3$ est obtenu après purification HPLC sur une colonne LiChrospher RP-18^e 250-10 (10µ) (Merck) à l'aide d'un gradient d'acétonitrile dans TEAAc aqueux (tampon A : 5% acétonitrile dans 25mM TEAAc , tampon B : 50% acétonitrile dans 25mM TEAAc ; débit 5
- 15 ml/min, gradient linéaire de 10% B à 20% B en 20 min puis gradient linéaire de 20% à 100% de B en 10 min. Les séquences incomplètes et ne comportant pas de CY5 sont éluées vers 20 min, les fractions contenant la séquence voulue $5'(\text{CY5}-(\text{T})_{15}\text{-2-oxyméthyl-6-aminohexanol})_3$ sont collectées vers 28 min (ces fraction sont colorées en bleu par la présence du groupe CY5).
- 20

- Les fractions contenant la séquence désirée sont réunies, évaporées à sec à l'aide d'un speed-vac, le résidu étant repris par de l'eau pure. Un spectre UV/visible (210 nm à 750 nm) réalisé sur une dilution de cette solution permet de connaître la concentration de l'oligonucléotide par son absorbance à 260 nm et de
- 25 caractériser la présence du groupe cyanine (CY5) par son absorbance à 650 nm.

Les composés CY5-T10-hexylamine et CY5-T5-hexylamine sont synthétisés de la même façon en faisant varier le nombre de cycles de synthèse dans le synthétiseur automatique.

- 30 **Exemple 2 : Activation des composés CY5-T15-hexylamine, CY5-T10-hexylamine, CY5-T5-hexylamine en 3' au SS₃CC**

Le composé CY5-T15-hexylamine obtenu dans l'exemple 1 est dissout dans un tampon PO₄ 200 mM et le pH est ajusté à 8.

On rajoute à la solution obtenue 250 équivalents de SSMCC. Le mélange réactionnel est incubé 30 min à température ambiante, sous agitation.

Le composé CY5-T15 NHS par SSMC, ci-après désigné CY5-T15-maléimide, est purifié sur colonne HR 10/30 G25 (SF) en tampon PO4 10 mM, 2mM
5 EDTA, pH7. La purification est effectuée à 60 ml/h.

La solution de CY5-T15-maléimide est concentrée par évaporation au speed vac.

On procède de la même façon pour CY5-T10-hexylamine.

Pour l'activation du composé CY5-T5-hexylamine, on utilise seulement 150
10 équivalents de SSMCC. Une étape supplémentaire de purification sur colonne HR 10/30 est nécessaire.

Exemple 3 : Activation de CY5-T15-hexylamine en 3' par le DSS (N-Disuccinimidyl suberate)

15 Le composé CY5-T15-hexylamine obtenu dans l'exemple 1 est repris dans 10 µl de tampon MOPS 100 mM pH 7,6 et 5 µl d'acétonitrile.

On ajoute à la solution obtenue 150 équivalents de DSS (35 mg/ml en DMF).

Le mélange réactionnel est incubé durant une nuit à 4°C avec agitation.

Le composé CY5-T15-hexylamine activé au DSS, ci-après désigné CY5-
20 T15-NHS est purifié sur colonne NAP 5 G25 (SF) en tampon MOPS 5mM pH 6,5.

Le composé CY5-T15-NHS est ensuite concentré par plusieurs précipitations au butanol et centrifugations. Le culot est repris dans l'eau.

On procède de la même façon pour l'activation des composé CY5-T10-hexylamine et CY5-T5-hexylamine.

25

Exemple 4 : Préparation du conjugué CY5-(T)_n - hexylamine activé par SSMCC (exemple 2) - anticorps anti-GST (GSS11)

GSS11-T15-CY5 lot 02B (mal) :

30 L'anticorps GSS11 (CIS bio international, France) en tampon carbonate 0.1M pH9 est activé par l'ajout de 8 équivalents de SPDP durant 30 min à température ambiante sous agitation puis par l'ajout de 20 mM final de DTT 15 min à température ambiante sans agitation.

Il est purifié sur une colonne HR 10/10 en G25 (SF) en tampon PO_4 0,1M pH7.

L'anticorps ainsi activé est mélangé à l'oligonucléotide CY5-T15- maléimide obtenu dans l'exemple 2 avec un rapport molaire initial de 7,6 CY5-T15-maléimide / anticorps GSS11. L'incubation est de 18 à 20 h à +4°C.

La concentration de l'anticorps pendant le couplage est de 0,5 mg/ml .

GSS11-T15-CY5 lot 03 (mal) :

L'anticorps GSS11 est uniquement activé par l'ajout de DTT à une concentration de 5 mM.

On procède ensuite comme pour le lot 02B ci-dessus, avec un rapport molaire initial de 10,8 CY5-T15-maléimide / anticorps GSS11.

La concentration de l'anticorps pendant le couplage est, dans ce cas, de 0,68 mg/ml.

GSS11-T5-CY5 lot 01 (mal) :

On procède comme pour le lot 02B ci-dessus, avec un rapport molaire initial de 8 CY5-T5-maléimide / anticorps GSS11.

La concentration de l'anticorps pendant le couplage de 0,9mg/ml.

GSS11-T10-CY5 lot 01 (mal) :

On procède de la même façon que pour le GSS11-T5-CY5 lot 01 (mal)

Les produits de couplage sont purifiés sur colonne HR 10/30 en Superdex 200 à 60 ml/h.

Le tampon d'élution est un tampon phosphate 0,1 M pH7.

Le suivi des purification se fait en utilisant un détecteur à barrettes de diodes (suivi à différentes longueurs d'onde).

Exemple 5 : Préparation du conjugué CY5-(T)_n - hexylamine activé par DSS

(exemple 3) - anticorps anti-GST (GSS11)

GSS11-T15-CY5 lot 01 (NHS) :

L'anticorps GSS11 en tampon carbonate 0,1M pH 9 est mélangé à la solution CY5-T15-NHS obtenue dans l'exemple 3. Le rapport molaire initial est de 8

CY5-T15-NHS / anticorps. La concentration de l'anticorps pendant le couplage est de 3,3 mg/ml. L'incubation est de 30 min à température ambiante sans agitation.

GSS11-T15-CY5 lot 02 (NHS) :

5 Le protocole est le même que pour GSS11-T15-CY5 lot 01 NHS avec un rapport molaire initial de 12 CY5-T15-NHS / anticorps. L'incubation est de 2h30 à température ambiante mais avec agitation.

 Les produits de couplage sont purifiés sur colonne HR 10/30 en Superdex 200 à 60 ml/h. Le tampon d'élution est un tampon phosphate 0,1 M pH7.

10 Le suivi des purification se fait en utilisant un détecteur à barrettes de diodes (suivi à différentes longueurs d'onde.

Exemple 6 : Synthèse du conjugué CY5sulfo-GSS11

15 Ces conjugués qui ne comprennent pas d'oligonucléotide servent de composés de référence pour montrer les avantages des conjugués selon l'invention.

 On utilise ici une cyanine sulfonée et non pas une cyanine non-sulfonée comme dans les exemple précédents car le rendement quantique de cette dernière est quasi nul si elle n'est pas couplée à un oligonucléotide.

20

GSS11-CY5sulfo lot M5 :

 On ajoute de la cyanine sulfonée (CY5sulfo) mono NHS à de l'anticorps GSS11 en tampon carbonate 0,1M pH 9.

 Le rapport molaire initial est de 4 CY5sulfo / anticorps.

25 L'incubation est de 1 h à température ambiante avec agitation, la concentration de l'anticorps pendant le couplage est de 5,2 mg/ml.

 La purification se fait sur colonne HR10/10 en G25 (SF) en tampon phosphate 0,1M pH7.

30

GSS11-CY5sulfo lot M6 :

 Le protocole est le même que pour le lot M5 ci-dessus mais avec un rapport molaire initial de 10 CY5sulfo/ anticorps.

GSS11-CY5sulfo lot M7 :

Le protocole est le même que pour le lot M5 ci-dessus mais avec rapport molaire initial de 20 CY5sulfo/ anticorps .

5 II - PROPRIETES PHOTOPHYSIQUES

Exemple 7 : Comparaison des rendements quantiques et du ratio DO max / DO 604 nm

10 Le rendement quantique reflète l'efficacité de l'entité fluorescente à restituer l'énergie qu'elle reçoit : plus celui-ci est élevé, plus l'entité fluorescente est efficace. Ces rendement quantiques sont mesurés en utilisant un fluorimètre. L'excitation est effectuée à 600 nm, la fluorescence est mesurée de 615 à 750 nm. L'aire des spectres de fluorescence obtenus est calculée et utilisée pour déterminer les rendements quantiques.

15 Le rapport molaire final (RMF) exprime le nombre de fluorophores couplés de manière covalente à la protéine.

20 Les spectres d'absorption des entités fluorescentes permettent de calculer le ratio DO max / DO 604 nm. Ce ratio reflète un éventuel phénomène d'agrégation des fluorophores, par exemple CY5, à la surface des protéines marquées, par exemple l'anticorps GSS11 ou la streptavidine.

Le rendement quantique et le ratio DO max / DO 604 nm sont déterminés pour différents composés synthétisés selon les exemples précédents.

25 7.1/ Les résultats rapportés dans le tableau 1 ci-dessous concernent les conjugués de référence (ne comprenant pas d'oligonucléotide) préparés dans l'exemple 6 ci-dessus.

Tableau 1

	Rapport molaire final (RMF)	DO _{Max} / DO _{604 nm}	Rendement quantique
CY5sulfo-mono NHS	-----	3.16	19 %
GSS11-CY5sulfo lot M5	2.20	2.18	11 %
GSS11-CY5sulfo lot M6	3.80	1.64	4 %
GSS11-CY5sulfo lot M7	6.00	1.24	1 %

Ces résultats montrent que le couplage de la cyanine sulfonée CY5sulfo
5 avec un anticorps GSS11 entraîne une diminution du rendement quantique, liée
notamment à un phénomène d'agrégation de CY5 à la surface de l'anticorps
comme le montre la diminution du rapport DO max / DO 604 nm.

Cette diminution est d'autant plus importante que le nombre de molécules
de CY5 par molécule d'anticorps (RMF) augmente.

10

7.2/ Les résultats rapportés dans le tableau 2 ci-dessous concernent les
conjugués préparés dans les exemples 4 et 5. Les composés CY5-T10-hexylamine
et CY5-T15-hexylamine utilisés à titre de références sont préparés comme décrits
dans l'exemple 1.

15

Tableau 2

	Rapport molaire final (RMF)	DO _{Max} / DO _{604 nm}	Rendement quantique
CY5-T15-hexylamine	-----	2.79	25 %
GSS11-T15-CY5 lot 02B (mal))	4.30	2.59	19 %
GSS11-T15-CY5 lot 03 (mal)	1.40	2.59	18 %
GSS11-T15-CY5 lot 01 (NHS)	2.00	2.67	20 %
GSS11-T15-CY5 lot 02 (NHS)	5.10	2.63	20 %
CY5-T10-hexylamine	-----	2.78	26 %
GSS11-T10-CY5 lot 01(mal)	4.60	2.38	14 %

Ces résultats montrent qu'en couplant l'anticorps GSS11 avec des entités
20 fluorescentes selon l'invention, on observe une très faible diminution du rendement

quantique et du rapport DO max / DO 604 nm en comparaison avec le conjugué de référence, pour des RMF croissants. Ceci montre clairement que les entités fluorescentes selon l'invention présentent des propriétés totalement inattendues en terme de diminution de l'agrégation à la surface de la protéine marquée (ici l'anticorps GSS11).

De plus, le résultat obtenu est indépendant du mode d'activation du composé CY5-T15-hexylamine (DSS ou SSMCC).

Exemple 8 : Spectre de fluorescence à concentration constante en anticorps

10

Afin de comparer le niveau de fluorescence obtenu avec les différents conjugués, des spectres d'émission de fluorescences (intensité de fluorescence en fonction de la longueur d'onde d'émission) ont été réalisés avec une concentration constante en anticorps (50 nM). Ces spectres sont réalisés sur un spectrofluorimètre LS50B (PerkinElmer), réglé de la façon suivante : longueur d'onde excitation 600 nm, longueur d'onde émission 315 à 750 nm, vitesse de balayage 480 nm/min. A partir de ces spectres, il est possible de déterminer l'intensité de fluorescence du conjugué en calculant l'aire du spectre obtenu par intégration.

20 La figure 1 donne la relation entre le RMF des conjugués GSS11-CY5 sulfo et GSS11-T15-CY5 et leur intensité de fluorescence.

Les symboles suivants sont utilisés :

- 25 —○— représente le conjugué GSS11-CY5 sulfo
—■— représente le conjugué GSS11-T15-CY5

Le graphe de la figure 1 montre que, dans les cas des conjugués GSS11-CY5sulfo, l'augmentation du RMF du conjugué conduit à une baisse de sa fluorescence globale, du fait de l'extrême agrégation du CY5 à la surface de l'anticorps. Par contre, dans le cas des conjugués GSS11-T15-CY5, l'absence d'agrégation du CY5 permet le maintien d'un rendement quantique élevé et, dès
30 lors, l'obtention d'une fluorescence globale quasiment proportionnelle au nombre de CY5 par anticorps.

III - UTILISATION DES ENTITES FLUORESCENTES SELON L'INVENTION DANS DES DOSAGES DE TYPE FRET (« Fluorescence Resonance Energy Transfer »)

5 Exemple 9 :

Les entités fluorescentes selon l'invention peuvent être utilisées dans des systèmes de type FRET bien connus de l'homme du métier.

10 Dans le présent exemple, la Glutathione S-transferase biotinylée (GST-biotine) est détectée par mesure de la fluorescence émise par un composé accepteur, résultant d'un transfert d'énergie entre un composé donneur (conjugué cryptate d'Europium-Streptavidine (K(Eu)-Sa)) et un accepteur contenant une entité fluorescente selon l'invention selon l'invention (conjugué GSS11-oligonucléotide-CY5).

15

Protocole d'essai :

L'essai est effectué en utilisant un fluorimètre (Discovery, Packard) dont la longueur d'onde d'excitation est 337 nm. La fluorescence est mesurée à 665 et 620 nm.

20 Tampon de l'essai : Hépès 50 mM pH7 0,1% BSA, 400mM KF.

Réactifs : GST-biotine solution 20 nM

Donneur : Sa-K(EU) NHS (CIS bio international)

Accepteur : GSS11-XL665 (CIS bio international) utilisé comme référence

25	GSS11-T15-CY5 lot 02B mal (ex. 4)	RMF 4,3
	GSS11-T15-CY5 lot 03mal (ex. 4)	RMF 1,4
	GSS11-T15-CY5 lot 01NHS (ex. 5)	RMF 2
	GSS11-T15-CY5 lot 02NHS (ex. 5)	RMF 5,1
	GSS11-T10-CY5 lot 01mal (ex. 4)	RMF 4,6
30	GSS11-T15-CY5 lot 01mal (ex.4)	RMF 8,7

On incube 20h à température ambiante le mélange suivant :

- 50 µl de GST-biotine à 0 – 0,31 – 0,62 – 1,25 – 2,5 ou 5 nM final

- 100 µl d'accepteur à 2,5 nM final

35 - 50 µl de donneur à 1 nM final

La figure 2 représente l'évolution du signal (% delta F) en fonction de l'évolution de la concentration en GST-biotine.

5 Les symboles suivants sont utilisés :

—○— GSS11-XL-665

—◇— représente le conjugué GSS11-T15-CY5 lot 02 NHS

—□— représente le conjugué GSS11-T15-CY5 lot 01 NHS

—△— représente le conjugué GSS11-T15-CY5 lot 02B mal

10 —x— représente le conjugué GSS11-T15-CY5 lot 03 mal

— — — représente le conjugué GSS11-T10-CY5 lot 01 mal

Le graphe de la figure 2 montre l'intérêt des entités fluorescentes selon l'invention en tant que marqueurs fluorescent dans un essai de type FRET. En effet, dans tous les cas, le signal observé en utilisant les entités fluorescentes selon l'invention est supérieur ou égal à celui obtenu avec le composé accepteur de référence (XL).

Exemple 10 : Durée de vie et efficacité de transfert des conjugués

20 Les durées de vie et l'efficacité de transfert obtenues dans le dosage de type FRET tel que celui de l'exemple précédent ont été calculées. Les conjugués testés ont été préparés comme décrit dans les exemples 4 et 5, le conjugué GSS11-XL665 servant de référence.

25 Les résultats sont rapportés dans le tableau 3 ci-dessous.

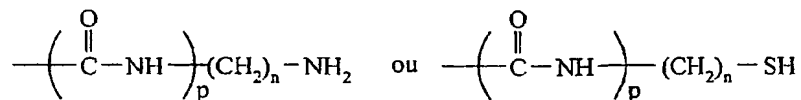
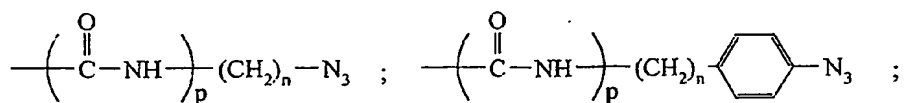
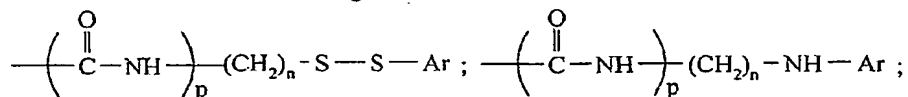
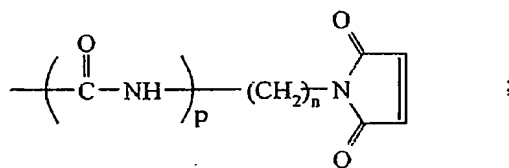
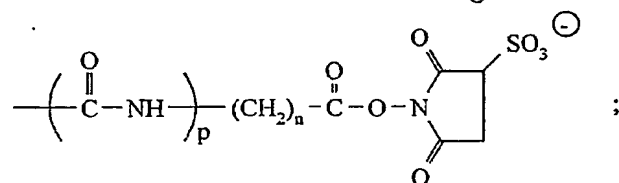
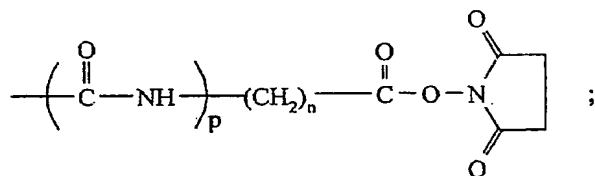
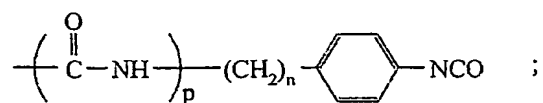
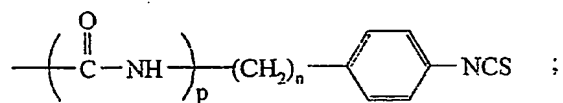
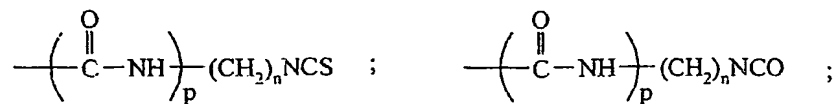
Tableau 3

	Sa-K lot 14 (produit générique NHS)		
	Durée de vie du FRET en ms (τ_{FRET})	Durée de vie du K libre en ms (τ_{cryptate})	Efficacité de transfert en % $1-(\tau_{\text{FRET}}/\tau_{\text{cryptate}})$
GSS11-T10-CY5 lot 01mal	0.16	0.969	83%
GSS11-T5-CY5 lot 01mal	0.21	1.030	80%
GSS11-T15-CY5 lot 03mal	0.21	1.054	79%
GSS11-T5-CY5 lot 02mal	0.16	1.001	83%
GSS11-T15-CY5 lot 01NHS	0.17	0.997	83%
GSS11-T15-CY5 lot 02NHS	0.13	1.038	87%
GSS11-XL665	0.27	1.033	73%

- 5 Les résultats montrent que l'efficacité du transfert d'énergie entre le composé donneur et les conjugués selon l'invention utilisés comme accepteurs est significativement plus élevée pour les conjugués selon l'invention que pour le conjugué XL665 (contrôle).

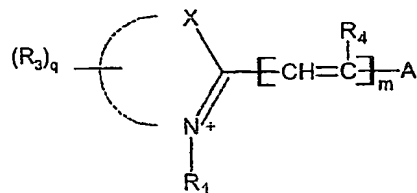
REVENDECATIONS

1. Entité fluorescente comportant un fluorophore à l'exception d'un cryptate de terre rare, lié de manière covalente à un ou plusieurs oligonucléotide(s) ou
5 analogue(s) d'oligonucléotide(s), caractérisée en ce qu'elle comporte au moins un groupe fonctionnel, introduit ou généré sur le fluorophore ou l'un des oligonucléotides ou analogues d'oligonucléotides.
2. Entité selon la revendication 1, caractérisée en ce que l'oligonucléotide ou
10 l'analogue d'oligonucléotide comprend de 2 à 60 unités nucléotidiques.
3. Entité selon les revendications 1 ou 2, caractérisée en ce que , le groupe fonctionnel peut être lié à ladite entité par l'intermédiaire d'un bras d'espacement.
- 15 4. Entité selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisée en ce que le fluorophore comprend un ou plusieurs noyaux aromatiques et a un coefficient d'extinction moléculaire élevé, supérieur à 20000, de préférence supérieur à 50000.
- 20 5. Entité selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisée en ce que le fluorophore est choisi parmi les rhodamines, les cyanines, les squaraines, les bodipys , les fluorescéines et leurs dérivés.
- 25 6. Entité selon l'une quelconque des revendication 1 à 5, caractérisée en ce que le groupe fonctionnel est choisi parmi les groupes : maléimide, acide carboxylique, haloacétamide, halogénure d'alkyle, azido, hydrazido, aldéhyde, cétone, amino, sulfhydryl, isothiocyanate, isocyanate, monochlorotriazine, dichlorotriazine, aziridine, halogénure de sulfonyle, halogénure d'acide, hydroxysuccinimide ester, hydroxysulfosuccinimide ester, imido ester, hydrazide,
30 azidonitrophényl, azidophényl, azide, 3-(2-pyridyl dithio)-propionamide, glyoxal et plus particulièrement les groupements de formule :



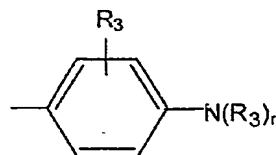
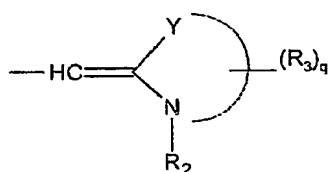
où n varie de 0 à 8 et p est égal à 0 ou 1, et Ar est un hétérocycle à 5 ou 6 chaînons comprenant 1 à 3 hétéroatomes, éventuellement substitué par un atome d'halogène.

7. Entité fluorescente selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, de formule (I):



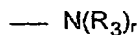
(I)

5 dans laquelle :
- A représente un groupe choisi parmi :



$r = 2 \text{ ou } 3$

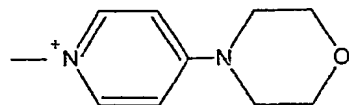
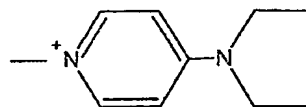
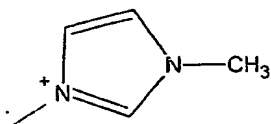
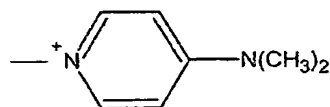
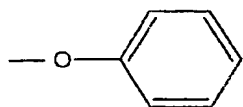
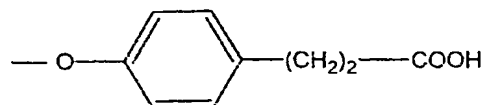
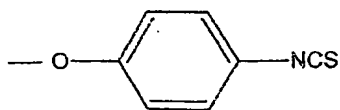
10



$r = 2 \text{ ou } 3$

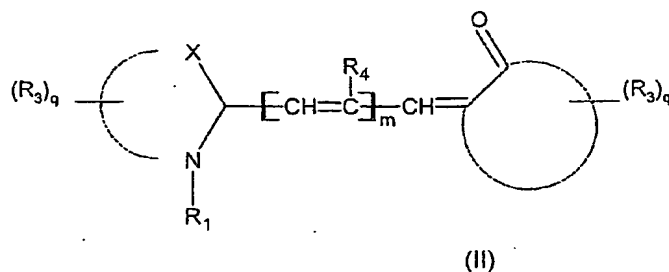
- les lignes en pointillé représentent chacune les atomes de carbone nécessaires pour former 1 à 3 cycles fusionnés, les groupes R_3 étant attachés à ces cycles ;
- X et Y représentent chacun N, C=O, O, S ou $C(CH_3)_2$;
- m vaut 1, 2, 3 ou 4 ;
- q vaut 1, 2 ou 3 ;
- $(R_3)_q$ représente q groupes R_3 , identiques ou différents ;
- les groupes R_1 , R_2 , R_3 sont identiques ou différents sont choisis parmi l'hydrogène; un groupe $-(CH_2)_s-Z$ dans lequel s varie de 0 à 4 et Z représente un groupe CH_3 , SO_3H , OH ou $N^+R_1R_2R_3$ dans lequel R_1 , R_2 et R_3 sont tels que définis ci-dessus ; un groupe fonctionnel tel que défini dans la revendication 6 ; et un oligonucléotide ou analogue d'oligonucléotide comportant éventuellement un groupe fonctionnel tel que défini dans la revendication 6 ;

- R_4 est choisi parmi : H ; OH ; CH_3 ; Cl et les groupes de formule :

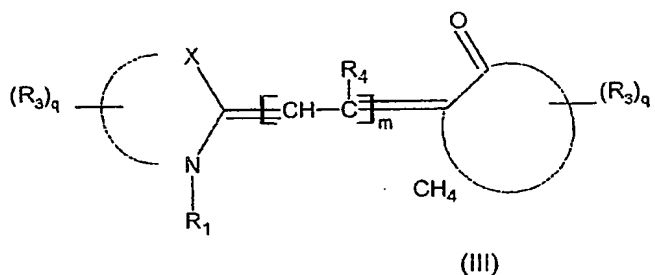


- 5 les substituants R_4 en position allylique pouvant former avec la chaîne polyéthylénique 1 à 3 cycles fusionnés contenant de 4 à 14 atomes, saturés ou non, lesdits cycles pouvant contenir un ou plusieurs atomes de O, N, S et éventuellement être substitués par un groupe oxo.

8. Entité fluorescente selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, de
10 formule (II) ou (III):

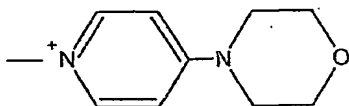
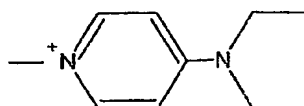
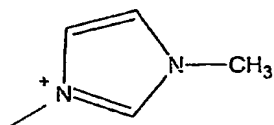
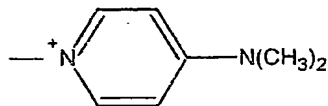
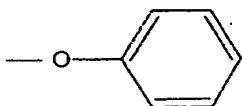
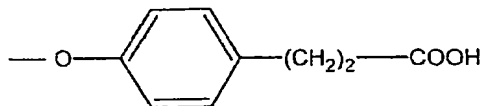
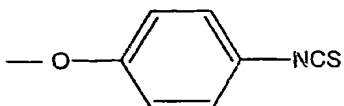


ou



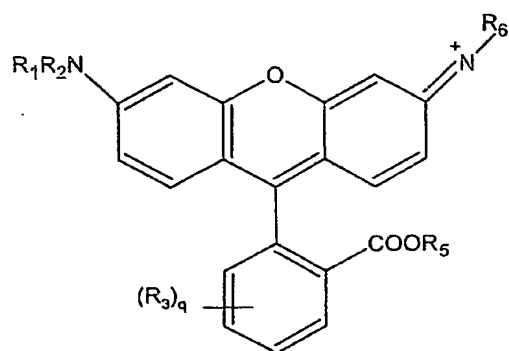
dans lesquelles

- les lignes en pointillé représentent chacune les atomes de carbone nécessaires pour former 1 à 3 cycles fusionnés, les groupes R_3 étant attachés à ces cycles ;
- 5 - X représente N, C=O, O, S ou $C(CH_3)_2$;
- m vaut 1, 2, 3 ou 4 ;
- q vaut 1, 2 ou 3 ;
- $(R_3)_q$ représente q groupes R_3 , identiques ou différents ;
- 10 - les groupes R_1 et R_3 , identiques ou différents sont choisis parmi l'hydrogène; un groupe $-(CH_2)_s-Z$ dans lequel s varie de 0 à 4 et Z représente un groupe CH_3 , SO_3H , OH ou $N^+R_1R_2R_3$ dans lequel R_1 , R_2 et R_3 sont tels que définis ci-dessus ; un groupe fonctionnel tel que défini dans la revendication 6 ; un oligonucléotide ou analogue d'oligonucléotide comportant éventuellement un
- 15 groupe fonctionnel tel que défini dans la revendication 6.
- R_4 est choisi parmi :H ; OH ; CH_3 ; Cl et les groupes de formule :

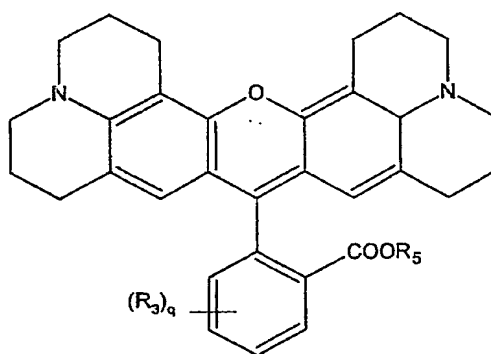


- les substituents R_4 en position allylique pouvant former avec la chaîne polyéthylénique 1 à 3 cycles fusionnés contenant de 4 à 14 atomes, saturés ou non, lesdits cycles pouvant contenir un ou plusieurs atomes de O, N, S et éventuellement être substitués par un groupe oxo.

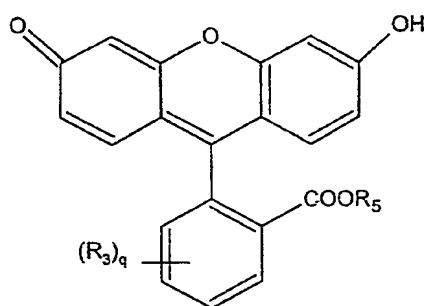
9. Entité fluorescente selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, de formule (IV), (V), (VI) ou (VII):



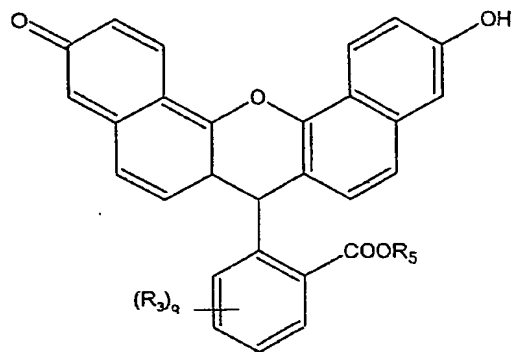
(IV)



(V)



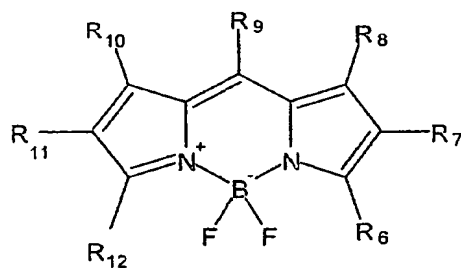
(VI)



(VII)

- dans lesquelles R_1 , R_2 , R_3 et R_5 sont identiques ou différents et sont choisis parmi l'hydrogène; un groupe $-(CH_2)_s-Z$ dans lequel s varie de 0 à 4 et Z représente un groupe CH_3 , SO_3H , OH ou $N^+R_1R_2R_3$ dans lequel R_1 , R_2 et R_3 sont tels que définis ci-dessus ; un groupe fonctionnel tel que défini dans la revendication 6 ; et un oligonucléotide ou analogue d'oligonucléotide comportant éventuellement un groupe fonctionnel tel que défini dans la revendication 6 ;
- q vaut 1,2 ou 3.

10 10. Entité fluorescente selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, de formule (VIII):



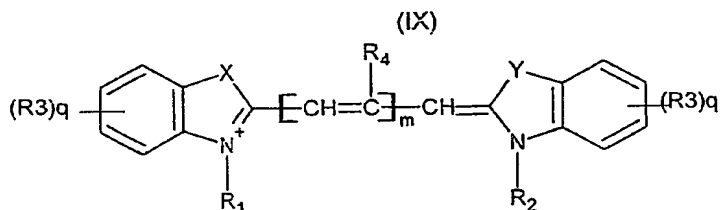
(VIII)

dans laquelle les substituants R_6 à R_{12} sont choisis parmi : l'hydrogène ; un halogène ; un alkyle ; un cycloalkyle ; aryl ; arylalkyl ; acyl ; sulfo ; un groupe fonctionnel tel que défini dans la revendication 6 ; et un oligonucléotide ou analogue

d'oligonucléotide comportant éventuellement un groupe fonctionnel choisi parmi ceux cités dans la revendication 6.

11. Entité selon la revendication 7, de formule (IX) :

5

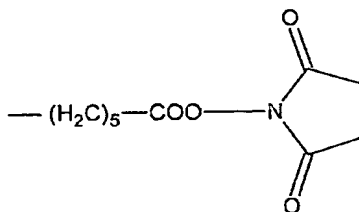


dans laquelle R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , X , Y , m et q sont tels que définis plus haut.

12. Entité selon la revendication 11, dans laquelle X et Y représentent chacun un groupe $C(CH_3)_2$.

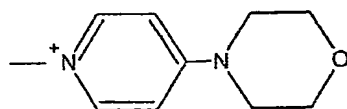
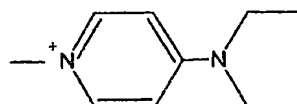
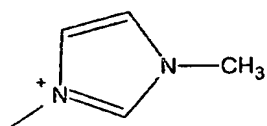
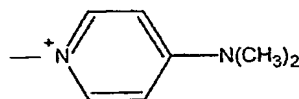
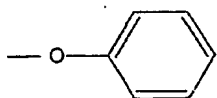
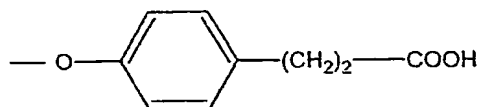
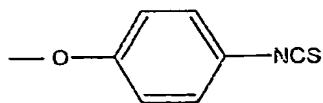
13. Entité selon la revendication 11, dans laquelle

15 - R_1 et R_2 représentent un alkyle comportant de 1 à 4 atomes de carbone ou un groupe de formule ci-dessous, l'un au moins des groupes R_1 et R_2 représentant un groupe de formule ci-dessous :



- R_4 représente l'hydrogène.
- $q = 1$, $m = 2$
- 20 - R_3 représente l'hydrogène; un groupe $-(CH_2)_5-Z$ dans lequel s varie de 0 à 4 et Z représente un groupe CH_3 , SO_3H , OH ou $N^+R_1R_2R_3$ dans lequel R_1 , R_2 et R_3 sont tels que définis ci-dessus ; un groupe fonctionnel tel que défini dans la revendication 6 ; un oligonucléotide ou analogue d'oligonucléotide comportant éventuellement un groupe
- 25 fonctionnel tel que défini dans la revendication 6 ;

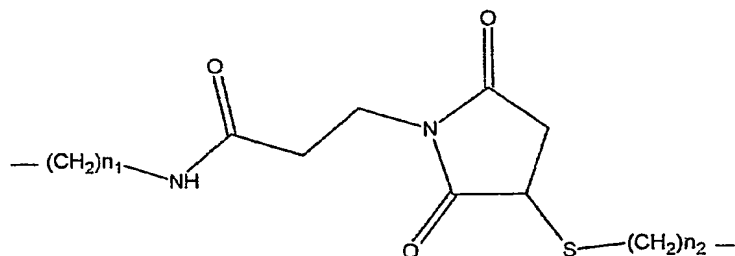
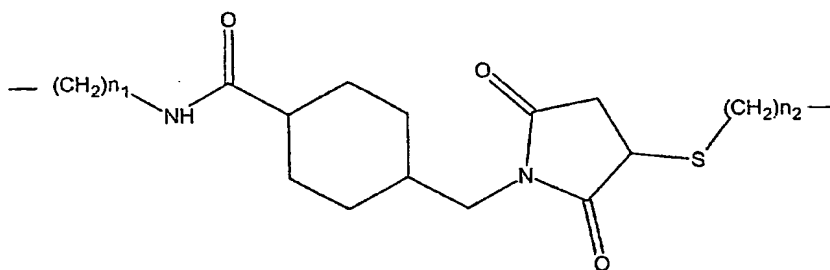
- R_4 est choisi parmi :H ; OH ; CH_3 ; Cl et les groupes de formule :



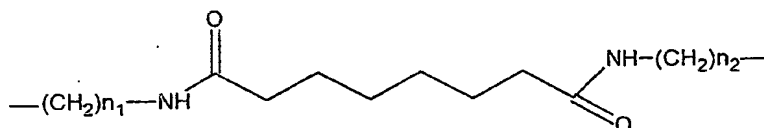
- 5 les substituants R_4 en position allylique pouvant former avec la chaîne polyéthylénique 1 à 3 cycles fusionnés contenant de 4 à 14 atomes, saturés ou non, lesdits cycles pouvant contenir un ou plusieurs atomes de O, N, S et éventuellement être substitués par un groupe oxo.
- 10 14. Entité selon l'une quelconque des revendications 1 à 13, caractérisée en ce que le fluorophore est lié de manière covalente à l'oligonucléotide soit directement, soit par l'intermédiaire d'un bras d'espacement.
- 15 15. Entité selon la revendication 14, caractérisée en ce que le fluorophore est lié à l'oligonucléotide par l'intermédiaire d'un bras d'espacement constitué par un radical organique bivalent, choisi parmi les groupes alkylène linéaires ou ramifiés en $\text{C}_1\text{-C}_{20}$, contenant éventuellement une ou plusieurs doubles liaisons ou triples liaisons et/ou contenant éventuellement un ou plusieurs hétéroatomes, tels que l'oxygène, l'azote, le soufre, le phosphore ou un ou plusieurs groupe(s) carbamoyle ou carboxamido ; les groupes cycloalkylène en $\text{C}_5\text{-C}_8$ et les groupes arylène en $\text{C}_6\text{-}$

C₁₄, lesdits groupes alkylène, cycloalkylène ou arylène étant éventuellement substitués par des groupes alkyle, aryle ou sulfonate.

16. Entité selon la revendication 15, caractérisée en ce que le bras
5 d'espacement est choisi parmi les groupes :



10



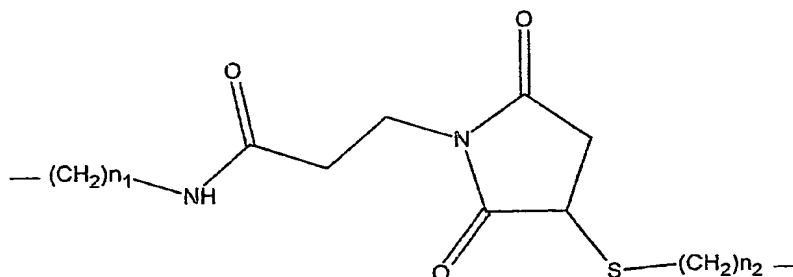
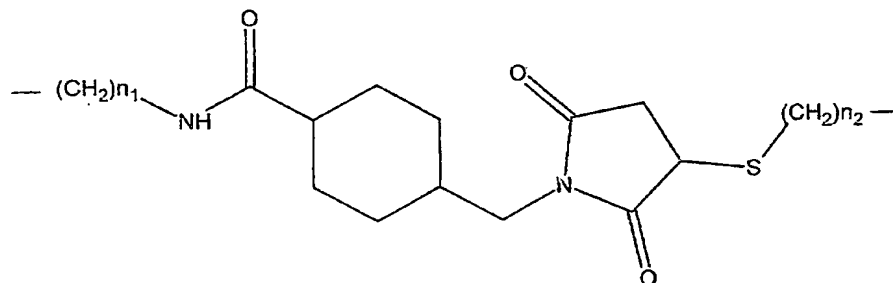
dans lesquels n₁ et n₂ sont compris entre 2 et 6.

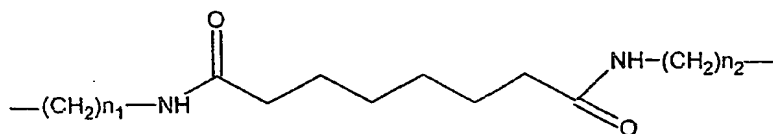
17. Entité selon l'une quelconque des revendications 1 à 16, caractérisée en ce
15 que l'oligonucléotide comprend de 5 à 60, en particulier 5 à 20, de préférence de 5 à 15 unités nucléotidiques.

18. Entité selon la revendication 17, caractérisée en ce que l'oligonucléotide est constitué d'un enchaînement d'unités ribonucléotides ou désoxyribonucléotides liées entre elles par des liaisons de type phosphodiester.
- 5 19. Entité selon la revendication 17, caractérisée en ce que l'oligonucléotide est constitué d'un enchaînement d'unités ribonucléotides ou désoxyribonucléotides ou d'unités analogues de nucléotide modifiées sur le sucre ou sur la base, liées entre elles par des liaisons internucléotidiques naturelles de type phosphodiester, une partie des liaisons internucléotidiques étant éventuellement remplacée par des liaisons phosphonate, phosphoramide ou phosphorothioate.
- 10 20. Entité selon la revendication 17, caractérisée en ce que l'oligonucléotide est constitué d'un enchaînement comprenant à la fois des unités ribonucléotides ou désoxyribonucléotides liées entre elles par des liaisons de type phosphodiester et des unités analogues de nucléosides liées entre elles par des liaisons amide.
- 15 21. Entité selon la revendication 17, caractérisée en ce que l'oligonucléotide est constitué d'un enchaînement d'unités ribonucléotides ou désoxyribonucléotides liées entre elles par des liaisons de type phosphodiester et d'unités analogues de nucléosides liées entre elles par des liaisons amide, ledit oligonucléotide comprenant au moins 5 liaisons internucléotidiques de type phosphodiester à l'extrémité destinée à être liée au fluorophore.
- 20 22. Entité selon l'une quelconque des revendications 1 à 21, caractérisée en ce que le groupe fonctionnel est une fonction amine d'une unité nucléotidique de l'oligonucléotide ou de l'analogue d'oligonucléotide, ou résulte de la réaction d'une fonction amine libre d'une unité nucléotidique de l'oligonucléotide ou de l'analogue d'oligonucléotide avec un groupe choisi parmi les groupes ester, acide carboxylique, isothiocyanate, aldéhyde, carbonyle, halogénure de sulfonyle, halogénure d'alkyle, azide, hydrazide, dichlorotriazine, anhydride, halogénoacétamide, maléimide et sulphydryle.
- 30 23. Entité selon l'une quelconque des revendications 1 à 22, caractérisée en ce que le groupe fonctionnel résulte de la réaction d'une fonction amine libre d'une

unité nucléotidique de l'oligonucléotide ou de l'analogue d'oligonucléotide avec un ester de N-hydroxysuccinimidyle.

24. Entité selon les revendications 1 à 23, caractérisée en ce que le ou les
 5 groupes fonctionnels sont liés au fluorophore et/ou à l'oligonucléotide par l'intermédiaire d'un bras d'espacement constitué par un radical organique bivalent, choisi parmi les groupes alkylène linéaires ou ramifiés en C₁-C₂₀, contenant éventuellement une ou plusieurs doubles liaisons ou triples liaisons et/ou contenant
 10 le phosphore ou un ou plusieurs groupe(s) carbamoyle ou carboxamido ; les groupes cycloalkylène en C₅-C₈ et les groupes arylène en C₆-C₁₄, lesdits groupes alkylène, cycloalkylène ou arylène étant éventuellement substitués par des groupes alkyle, aryle ou sulfonate.
- 15 25. Entité selon la revendication 24, caractérisée en ce que le bras d'espacement est choisi parmi les groupes :





dans lesquels n_1 et n_2 sont compris entre 2 et 6.

- 5 26. Conjugué fluorescent constitué d'une entité selon l'une quelconque des revendications 1 à 25 liée de manière covalente à une molécule porteuse.
27. Conjugué selon la revendication 26, caractérisée en ce que le rapport molaire final est supérieur à 0 et inférieur à 100, de préférence supérieur à 0 et inférieur à 20.
- 10 28. Conjugué fluorescent selon l'une des revendications 26 ou 27, caractérisé en ce que la molécule porteuse est un anticorps, un antigène, un messager intracellulaire, un messager intercellulaire, une protéine, un peptide, un haptène, une lectine, la biotine, l'avidine, la streptavidine, une toxine, un glucide, un oligosaccharide, un polysaccharide, un acide nucléique, une hormone, une vitamine, un médicament, un polymère, une particule polymérique, du verre, une particule de verre ou une surface en verre ou en polymère.
- 15 29. Conjugué fluorescent selon la revendication 28, caractérisé en ce que la molécule porteuse est un anticorps ou la streptavidine.
- 20 30. Utilisation d'une entité fluorescente selon l'une quelconque des revendications 1 à 25 ou d'un conjugué fluorescent selon l'une quelconque des revendications 26 à 29 comme traceur fluorescent.
- 25 31. Utilisation selon la revendication 30, pour la détection et/ou la détermination par fluorescence d'un analyte dans un milieu susceptible de le contenir.
- 30 32. Utilisation selon la revendication 31, pour la détermination d'une interaction entre biomolécules ; pour la détermination d'une activité biologique telle que : une

activité enzymatique, l'activation d'un récepteur membranaire, la transcription d'un gène, un transport membranaire, une variation de la polarisation membranaire.

5 33. Utilisation selon les revendications 30 à 32 dans un procédé de criblage de médicaments.

10 34. Utilisation selon la revendication 33, dans laquelle on utilise un conjugué fluorescent selon l'une quelconque des revendications 26 à 29 en tant que composé fluorescent accepteur en présence d'un composé fluorescent donneur.

35. Utilisation selon la revendication 34, dans laquelle on utilise un conjugué fluorescent selon l'une quelconque des revendications 26 à 29 en tant que composé fluorescent donneur en présence d'un composé fluorescent accepteur.

15 36. Utilisation selon la revendication 34, en microscopie de fluorescence, en cytométrie de flux, en polarisation de fluorescence ou en corrélation de fluorescence.

20 37. Utilisation d'un conjugué selon l'une des revendications 26 à 30 en tant qu'agent de contraste pour l'imagerie optique *in vivo*.

25 38. Procédé d'augmentation de l'intensité de fluorescence d'un fluorophore lié à une molécule porteuse, caractérisé en ce qu'on utilise comme fluorophore une entité fluorescente selon l'une des revendications 1 à 25.

39. Procédé de diminution du phénomène d'agrégation à la surface d'une molécule porteuse liée à un fluorophore, caractérisé en ce qu'on utilise à la place dudit fluorophore une entité fluorescente selon l'une des revendications 1 à 25.

30 40. Procédé d'augmentation de rendement quantique d'un fluorophore lié à une molécule porteuse, caractérisé en ce qu'on utilise comme fluorophore une entité fluorescente selon l'une des revendications 1 à 25.

FIGURE 1

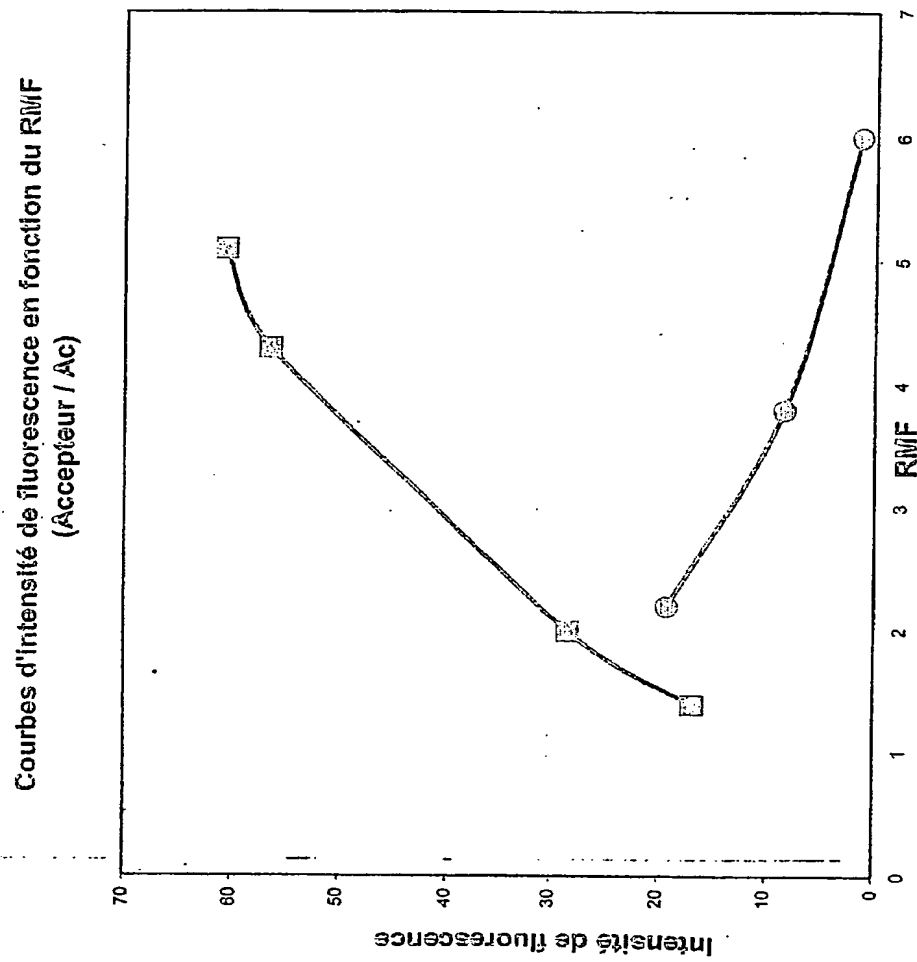
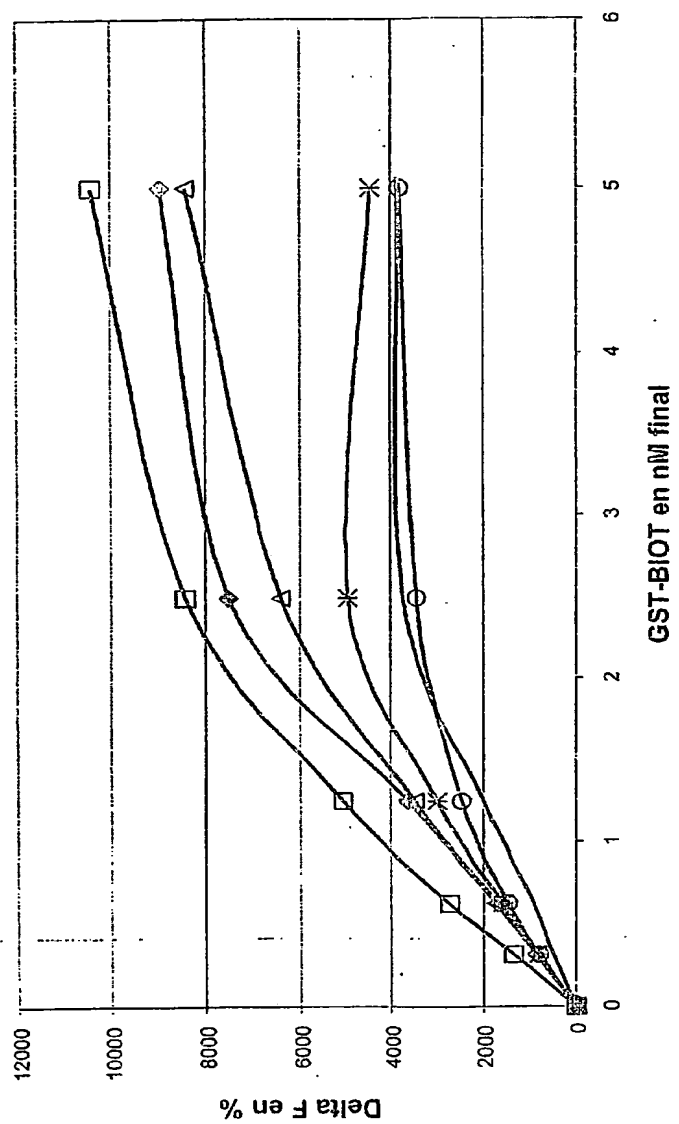


FIGURE 2



reçue le 25/06/02

BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI



INPI
N° 11239

DÉPARTEMENT DES BREVETS

26 bis, rue de Saint Pétersbourg

75800 Paris Cedex 08

Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04 Télécopie : 33 (1) 42 94 86 54

DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° 1. / 2.

(Si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)



Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

OS 113 W / 200201

Vos références pour ce dossier (facultatif)		H1C9130/19/CBU	
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL		206948	
TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum) Entité fluorescente comportant un fluorophore lié de manière covalente à au moins un oligonucléotide et comportant au moins un groupe fonctionnel et ses utilisations			
LE(S) DEMANDEUR(S) : CIS bio international			
DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) : (Indiquez en haut à droite «Page N° 1/1» S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez un formulaire identique et numérotez chaque page en indiquant le nombre total de pages).			
Nom		TRINQUET	
Prénoms		Eric	
Adresse	Rue	Chemin Columbia	
	Code postal et ville	13 0 1 3 0 Pont Saint-Esprit FRANCE	
Société d'appartenance (facultatif)			
Nom		MAURIN	
Prénoms		Fabrice	
Adresse	Rue	La Croze	
	Code postal et ville	13 0 2 0 0 Saint-Nazaire FRANCE	
Société d'appartenance (facultatif)			
Nom		BAZIN	
Prénoms		Hervé	
Adresse	Rue	14 allée de la Chenaie	
	Code postal et ville	13 0 4 0 0 Villeneuve lès Avignon FRANCE	
Société d'appartenance (facultatif)			
DATE ET SIGNATURE(S) DU (DES) DEMANDEUR(S) OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire) CABINET BEAU DE LOMERIE Paris, le 08 Juin 2002 Philippe HUBERT CPI N° 94-0308			

La loi n°78-17 du 6 janvier 1978 relative à l'informatique, aux fichiers et aux libertés s'applique aux réponses faites à ce formulaire.
Elle garantit un droit d'accès et de rectification pour les données vous concernant auprès de l'INPI.

reçue le 25/06/02

BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI



N° 11235-02

DÉPARTEMENT DES BREVETS

26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75300 Paris Cedex 08

Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04 Télécopie : 33 (1) 42 94 86 54

DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° 2./2...

(Si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)



Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

08 113 W / 300301

Vos références pour ce dossier (facultatif)		H189130/19/CBU	
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL		0206968	
TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum) Entité fluorescente comportant un fluorophore lié de manière covalente à au moins un oligonucléotide et comportant au moins un groupe fonctionnel et ses utilisations			
LE(S) DEMANDEUR(S) : CIS bio international			
DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) : (Indiquez en haut à droite «Page N° 1/1» S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez un formulaire identique et numérotez chaque page en indiquant le nombre total de pages).			
Nom		MATHIS	
Prénoms		Gérard	
Adresse	Rue	17 impasse Capelle-des-Ladres	
	Code postal et ville	1310121010 Bagnols sur Cèze FRANCE	
Société d'appartenance (facultatif)			
Nom			
Prénoms			
Adresse	Rue		
	Code postal et ville	[] [] [] [] [] [] [] [] [] []	
Société d'appartenance (facultatif)			
Nom			
Prénoms			
Adresse	Rue		
	Code postal et ville	[] [] [] [] [] [] [] [] [] []	
Société d'appartenance (facultatif)			
DATE ET SIGNATURE(S) DU (DES) DEMANDEUR(S) OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire) Paris, le 05 Juin 2002 CABINET BEAU DE LOMENIE Philippe HUBERT CPI N° 94-0308			

La loi n°78-17 du 6 janvier 1978 relative à l'informatique, aux fichiers et aux libertés s'applique aux réponses faites à ce formulaire.
Elle garantit un droit d'accès et de rectification pour les données vous concernant auprès de l'INPI.

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.